

SEPARATION OF POLYNUCLEOTIDE AND APPARATUS THEREFOR

Patent Number: JP2000279169
Publication date: 2000-10-10
Inventor(s): YASUDA KENJI; OKANO KAZUNOBU; KATO KOICHI
Applicant(s):: HITACHI LTD
Requested Patent: ☐ JP2000279169 (JP00279169)
Application Number: JP19990157268 19990604
Priority Number(s):
IPC Classification: C12N15/09 ; C12M1/00 ; C12Q1/68
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PROBLEM TO BE SOLVED: To efficiently separate a polynucleotide in high accuracy by supplying a sample solution containing a polynucleotide onto a substrate to which a predetermined single-stranded oligonucleotide probe is immobilized and recovering only a polynucleotide hybridized complementarily to the probe under specific conditions.

SOLUTION: A single-stranded oligonucleotide probe having a specific base sequence is immobilized in each area of a substrate 1 having a plurality of independent areas on the surface and a sample solution containing a polynucleotide is supplied onto the substrate and the sample is heated up to a predetermined temperature and then, the temperature is lowered and each polynucleotide complementary to each probe is hybridized to each probe and the sample solution above the substrate 1 is replaced with a solution containing no polynucleotide and the surface of the substrate at one area of the plurality of independent areas on the substrate 1 is heated up to a predetermined temperature and only a polynucleotide hybridized complementarily to the probe immobilized to the area is denatured and recovered to separate the polynucleotide.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-279169

(P2000-279169A)

(43) 公開日 平成12年10月10日 (2000. 10. 10)

| (51) IntCl. ⁷ | 識別記号 | F I | テームコード(参考) |
|--------------------------|------|---------------|-------------|
| C 1 2 N 15/09 | | C 1 2 N 15/00 | A 2 G C 4 5 |
| C 1 2 M 1/00 | | C 1 2 M 1/00 | A 4 B 0 2 4 |
| C 1 2 Q 1/68 | | C 1 2 Q 1/68 | A 4 B 0 2 9 |
| // G 0 1 N 33/50 | | G 0 1 N 33/50 | P 4 B 0 6 3 |

審査請求 未請求 請求項の数29 O L (全 21 頁)

(21) 出願番号 特願平11-157268
(22) 出願日 平成11年6月4日 (1999. 6. 4)
(31) 優先権主張番号 特願平10-163213
(32) 優先日 平成10年6月11日 (1998. 6. 11)
(33) 優先権主張国 日本 (J P)
(31) 優先権主張番号 特願平10-330536
(32) 優先日 平成10年11月20日 (1998. 11. 20)
(33) 優先権主張国 日本 (J P)
(31) 優先権主張番号 特願平10-364059
(32) 優先日 平成10年12月22日 (1998. 12. 22)
(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000005108
株式会社日立製作所
東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地
(72) 発明者 安田 賢二
埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地株式会社
日立製作所基礎研究所内
(72) 発明者 岡野 和宣
東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地株
式会社日立製作所中央研究所内
(74) 代理人 100061893
弁理士 高橋 明夫 (外1名)

最終頁に続く

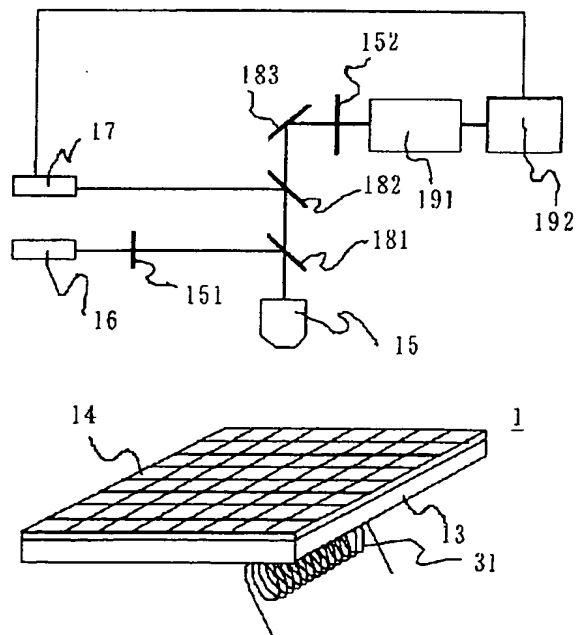
(54) 【発明の名称】 ポリヌクレオチド分離方法および装置

(57) 【要約】

【課題】 標的ポリヌクレオチドを効果的に分取する。

【解決手段】 表面に独立した領域を有する基板の各領域に特定の塩基配列を有するプローブを固定し、これに試料溶液中相補性のあるポリヌクレオチドを結合させるとともに、前記基板上の独立した領域のそれぞれの領域の部分を順次温度をあげた後温度を下げて溶液を回収することによりそれぞれのプローブに対応するポリヌクレオチドを分離して得る。

図 2



【特許請求の範囲】

【請求項 1】以下の手順よりなるポリヌクレオチド分離方法。表面に独立した複数の領域を有する基板の各領域に特定の塩基配列を有する一本鎖オリゴヌクレオチドブローブを固定すること、

該基板上にポリヌクレオチドを含む試料溶液を供給すること、該試料溶液を所定の温度にあげた後温度を下げて前記各ブローブと相補性のあるそれぞれのポリヌクレオチドを各ブローブに結合させること、

該基板上の溶液を試料溶液からポリヌクレオチドを含まない溶液に交換すること、および前記基板上の独立した複数の領域のうち一つの領域の基板表面の温度を所定の温度にあげることで、前記領域に固定されたブローブと相補的に結合したポリヌクレオチドのみを解離させ、これを回収すること。

【請求項 2】以下のものよりなるポリヌクレオチド分離装置。表面の独立した複数の領域にそれぞれ特定の塩基配列を有する一本鎖オリゴヌクレオチドブローブを固定された基板、

該基板上にポリヌクレオチドを含む試料溶液を供給する手段、

該基板上の溶液を試料溶液からポリヌクレオチドを含まない溶液に交換する手段、

該試料溶液を所定の温度にあげる温度制御手段、

前記基板上の独立した複数の領域のうち特定の一つの領域の部分のみの基板表面の温度を所定の温度にあげる温度制御手段、および前記基板上の試料溶液を回収する手段。

【請求項 3】前記基板上の各領域のブローブに捕獲されたポリヌクレオチドに関する蛍光色素の蛍光強度、あるいはポリヌクレオチド自体が持つ自家蛍光の強度を前記基板の各領域について定量的に検出する手段を有する請求項 2 記載のポリヌクレオチド分離装置。

【請求項 4】前記蛍光観察に用いる励起光の波長として 280 nm より 650 nm の光を用いる請求項 3 記載のポリヌクレオチド分離装置。

【請求項 5】定量的に検出した前記基板の各領域に捕獲された核酸試料あるいは前記基板表面に付加された蛍光色素の蛍光強度の変化、あるいは前記核酸試料の自家蛍光の強度変化より前記各領域の温度を解析する手段を有する請求項 3 記載のポリヌクレオチド分離装置。

【請求項 6】前記蛍光色素より発せられた蛍光の強度を検出する手段によって得られた前記基板の各領域の温度に関する解析結果を基に、基板表面の特定の領域の温度を回帰制御する手段を有する請求項 5 記載のポリヌクレオチド分離装置。

【請求項 7】サーミスタあるいは熱電対により前記各領域の温度を解析する手段を有する請求項 2 記載のポリヌクレオチド分離装置。

【請求項 8】前記サーミスタあるいは熱電対により前記

各領域の温度を解析する手段によって得られた前記基板の各領域の温度に関する解析結果を基に、基板表面の特定の領域の温度を回帰制御する手段を有する請求項 7 記載のポリヌクレオチド分離装置。

【請求項 9】前記基板の各領域に設けられた高い光吸収特性を持つ薄膜層あるいは微粒子層と、集束光を前記基板上の特定の領域の薄膜層あるいは微粒子層に選択的に照射する手段を備え、前記特定の微小領域が選択的に照射される光の光吸収によって局所的に加熱されるものである請求項 2 記載のポリヌクレオチド分離装置。

【請求項 10】前記微小領域を加熱するために用いる集束光の波長として核酸が吸収を持たない波長の光を用いる請求項 9 記載のポリヌクレオチド分離装置。

【請求項 11】表面に各々異なるブローブを固定した分割された複数の領域を持つ基板において、400 nm より長波長の光を吸収する物質が塗布あるいは散布あるいは蒸着されていることを特徴とする請求項 9 項のポリヌクレオチド分離装置。

【請求項 12】前記蛍光観察用に用いる励起光の波長、蛍光観察する光の波長、および微小領域を加熱する集束光の波長が互いに異なっている請求項 9 記載のポリヌクレオチド分離装置。

【請求項 13】基板に比して極めて高い光吸収特性を持つ微粒子球と、開口数 1.2 以上の集束光によって生じる光輻射圧によって溶液中に浮遊する前記微粒子を捕獲する手段と、前記微粒子を前記光輻射圧による捕獲手段によって前記基板上の特定の領域近傍に自在に移動させ基板上の特定の領域を局所的に加熱する手段を有する請求項 2 記載のポリヌクレオチド分離装置。

【請求項 14】前記基板の各領域各々に付加された発熱体層のアレーと、前記発熱体層の一つを発熱させることによって特定の微小領域を局所的に加熱する手段とを有する請求項 2 記載のポリヌクレオチド分離装置。

【請求項 15】前記基板の形状が管状であり、その内表面に各々異なる核酸ブローブを固定した分割された複数の領域を持つ細管に試料核酸溶液を導入する手段と、前記ブローブと前記試料溶液中のポリヌクレオチド成分とを結合させるための温度制御手段と、前記管内の基板表面のブローブと結合しなかった試料溶液中のポリヌクレオチドを除去する手段と、前記細管内の複数の領域のうちの特定の領域を加熱しその領域のブローブに結合した前記試料溶液中のポリヌクレオチド成分を解離させる手段と、前記解離した核酸成分を回収する手段からなる請求項 2 記載のポリヌクレオチド分離装置。

【請求項 16】前記内面に各々異なる核酸ブローブを固定した分割された複数の領域を持つ細管に試料核酸溶液を導入する手段と、前記ブローブと前記試料溶液成分とを結合させるための温度制御手段と、前記管内の基板表面のブローブと結合しなかった試料溶液中のポリヌクレオチドを除去する手段と、前記細管内の複数の領域のう

ちの特定の領域のみに接するように核酸を含まない液滴を配置する手段と、前記細管を加熱し前記液滴が接した領域のみの核酸プローブに結合した前記試料溶液成分を解離させる手段と、前記解離した核酸成分を含む液滴を回収する手段からなる請求項15記載のポリヌクレオチド分離装置。

【請求項17】前記内面に各々異なるプローブを固定した円筒状に分割された複数の領域を持つ細管と、前記細管に試料溶液および洗浄液および空気を導入する手段と、前記細管の前記各領域を各々独立に加熱する手段と、前記細管の特定の領域を加熱しその領域の核酸プローブに結合した前記試料溶液成分を解離させ回収する手段からなる請求項16記載のポリヌクレオチド分離装置。

【請求項18】前記基板表面に金属の薄膜層を有し、前記金属薄膜層の表面に形成された金属酸化物と架橋剤によって前記プローブが結合している請求項2記載のポリヌクレオチド分離装置。

【請求項19】金属酸化膜層が350nm以上633nm未満の範囲のコヒレント光あるいは連続波長からなる光を吸収する請求項18記載のポリヌクレオチド分離装置。

【請求項20】金属酸化膜層が633nm以上1053nm以下の範囲のコヒレント光あるいは連続波長からなる光を吸収する請求項18記載のポリヌクレオチド分離装置。

【請求項21】活性残基AとリンカーRと酸化表面を有する金属Meからなる一般式A-R-O-Meからなる金属表面を有し、活性残基Aを介してポリヌクレオチドプローブを固定した構造を持つ請求項18記載のポリヌクレオチド分離装置。

【請求項22】酸化表面を有する金属表面にシランカップリング試薬により活性残基を導入し、概活性残基を介してポリヌクレオチドプローブを固定した構造を持つ請求項21記載のポリヌクレオチド分離装置。

【請求項23】活性残基Aがグリシドキシ基で、アミノ基を有するポリヌクレオチドプローブを固定した構造を持つ請求項21記載のポリヌクレオチド分離装置。

【請求項24】金属酸化膜層がCr、Ti、V、Fe、Co、Ni、Mo、W、のいずれかの金属酸化物を有することを特徴とする請求項18記載のポリヌクレオチド分離装置。

【請求項25】前記基板表面に直流電場を印加する手段を有する請求項2記載のポリヌクレオチド分離装置。

【請求項26】試料をふくむ溶液のpHを4以下にして前記直流電場を印加して核酸プローブで修飾された基板表面に核酸成分のみを引き寄せる手段を有する請求項25記載のポリヌクレオチド分離装置。

【請求項27】前記基板表面に交流電場を印加する手段を有する請求項2記載のポリヌクレオチド分離装置。

【請求項28】試料溶液を保持する容器と、2次元に分割された複数の領域を持ち、表面の前記各領域がそれぞれ核酸プローブで修飾された基板と、前記基板の各領域に独立に交流あるいは直流電場を印加する手段と、前記基板の各領域を独立に発熱させる手段と、前記捕獲された細胞が存在する領域を確認し、かつ、マーカーによって染色された細胞の位置を確認する手段とを有する請求項2記載のポリヌクレオチド分離装置。

【請求項29】前記各領域が各々独立に60℃以上95℃以下まで加熱することが可能な発熱手段を用いた請求項2記載のポリヌクレオチド分離装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、複数の異なる配列を持ったポリヌクレオチドの混合試料あるいは細胞より特定の塩基配列を持つポリヌクレオチドのみを選択的に分離回収する方法および装置に関する。

【0002】

【従来の技術】DNAの特定の塩基配列を高速かつ簡便に検出するために使用されるものの一つにDNAチップがある。これは半導体微細加工技術で用いられるマイクロパターンニングの技術とDNAの相補性を利用したものである。基板上の2次元に領域分割された各領域上に、様々な配列を持つ塩基長8-9程度のプローブとしての一本鎖のオリゴヌクレオチドをそれぞれ固定しておき、この基板上にDNAを含む試料溶液を滴下して、基板上の各領域のプローブと結合させ、この結合の際、同時に蛍光色素を結合させることにより、このプローブと試料溶液中のDNAとの結合の程度を光学的に観測することで試料溶液中のDNAの塩基配列を解析する。

【0003】プローブとしての特定のオリゴヌクレオチド（DNAまたはRNA）を固相に捕捉する方法は、たとえば、米国特許4,446,237に開示されている。この方法では、特定のオリゴヌクレオチドを含む溶液を加熱し、オリゴヌクレオチドを変性させて一本鎖とした後、これを、ニトロセルロース膜表面に固定する。また、プローブとしての特定のオリゴヌクレオチドを固相に捕捉する他の方法は、S R Rasmussen et al, Analytical Biochemistry 198, 128~142 (1991)に記載されている。この方法では、オリゴヌクレオチドの5'末端のリン酸基を1-メチルイミダゾールと1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミドを用いて活性化し、2級アミンを導入したポリスチレンマイクロプレートの表面に固定する。この方法では2級アミンと活性化した5'末端のリン酸基が反応するのでオリゴヌクレオチドの5'末端側がマイクロプレート表面に共有結合で固定される。

【0004】このように、プローブとしての特定のオリゴヌクレオチドが膜表面に固定されていれば、これと相補性のあるポリヌクレオチド（DNAまたはRNA）を

選択的にこれに結合させることができるから、試料溶液中に含まれるポリヌクレオチドを解析することができるのであり、DNAチップはこの考え方を基礎としたものである。

【0005】一方、選択的に分離回収しようとするポリヌクレオチドを、チップ上に固定されたプローブによって捕獲し、次にチップ全体を加熱し熱変性によって捕獲されたプローブ上のポリヌクレオチドをチップから分取する手法に関しては、すでに米国特許5,607,646に岡野らが報告している。

【0006】また、ゲル中のポリヌクレオチドの電気泳動の速度差を用いて、特定のポリヌクレオチドを選択的に分離回収しようとすることも広く行われている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】上記従来技術で述べたDNAチップによる遺伝子解析技術は、基板上に形成された長さが8-9塩基ほどのプローブ（特定の一本鎖オリゴヌクレオチド）と試料溶液中のポリヌクレオチド

（DNAあるいはRNA）の一本鎖ポリヌクレオチドとを相補的に結合させることにより捕獲し、観察する技術であり、基板上のプローブに捕獲されたDNAあるいはRNA一本鎖ポリヌクレオチドをさらに選択的に基板上から分離し回収することについては考慮されていなかった。

【0008】また、従来は分離、回収したいポリヌクレオチドを細胞から直接的に抽出することは考えられていなかった。

【0009】さらに、従来の電気泳動を用いた分離技術では、ポリヌクレオチドの移動度は互いに相対的なものであり泳動条件の変化によって変動してしまい、分離回収された試料溶液成分の同定が必要であった。また拡散により泳動中のポリヌクレオチドが互いに混ざってしまう可能性があり、正確に極微量のポリヌクレオチドを分離、精製することは困難であった。

【0010】本発明のポリヌクレオチド分離方法および装置は特定の塩基配列を持つ微量のポリヌクレオチド

（DNAあるいはRNA）を高精度、高速に選択的に分離、回収する方法および手段を提供することを目的とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明は、上記目的を達成するため、基板上の分割された表面の各領域をそれぞれ異なる塩基配列のプローブ（特定のオリゴヌクレオチド）で修飾し、該プローブに試料溶液中のポリヌクレオチド（DNAあるいはRNA）を結合させ、次いで、基板の特定の領域のみを選択的に加熱して、前記プローブに相補的に結合しているポリヌクレオチドのみを該プローブから遊離させることにより、試料溶液中から希望するポリヌクレオチドのみを選択的に分離、回収することを提案するものである。

【0012】

【発明の実施の形態】図1は本発明のポリヌクレオチド分離方法および装置が遺伝子の解析および選択的な回収処理の中で占める位置を説明するための遺伝子処理のフロー図である。801および802は準備過程であり、それぞれ、検体細胞導入および検体液体導入の過程である。本発明は細胞自体を検体とする場合および体液を検体とする場合のいずれにも対応できる。803は細胞内から細胞の内容物を抽出する過程である。804はPCR増幅の過程であり、分取したいポリヌクレオチドの濃度の薄いときは実行される。805は本発明の特徴的な過程であり、複数の独立した領域に試料成分を固定する過程である。806は固定された試料成分の状況を観察解析する過程である。807は独立した領域から試料成分を分離して回収する過程である。

【0013】以下、具体的に説明するように、本発明では、複数の独立した領域に試料成分を固定する過程をもつことと、この領域からそれぞれの成分を分離して回収することとにより、効率的な分取が可能となる。

【0014】実施例I

図2は本発明の第1の実施例の基本構成を示す模式図である。1は基板であり、その表面に分離、回収したい標的ポリヌクレオチドを捕獲固定する。13は基板ベースである。14は標的ポリヌクレオチド捕獲領域であり、基板ベース13の表面に光露光技術により1ミクロン四方程度に分割され、2次元に展開されている。この標的ポリヌクレオチド捕獲領域14の表面には、各領域ごとに配列の異なる塩基長8-9塩基程度のプローブ（一本鎖オリゴヌクレオチド）が複数本結合している。このプローブは試料溶液中の標的ポリヌクレオチドと相補性のあるオリゴヌクレオチドである。したがって、標的ポリヌクレオチド捕獲領域14の面に試料溶液が来ると、プローブと標的ポリヌクレオチドとが結合する。すなわち、標的ポリヌクレオチドがプローブに捕獲される。そして、プローブと標的ポリヌクレオチドとが結合するとき蛍光色素が同時に結合するものとされている。31はヒーターであり、基板1の背面に設けられ、基板1の全体の表面を室温程度から95℃程度まで加熱することが出来る。15は対物レンズである。前記基板1は対物レンズ15の光軸に対して垂直に配置されている。16は蛍光観察用光源、17は集束光照射用赤外レーザー光源であり、光源のそれぞれは対物レンズ15の光軸に対して垂直に配置される。181、182はそれぞれダイクロイックミラーであり、対物レンズ15の光軸とそれぞれの光源16、17の光軸とが交わる位置に配置されて、光源16、17から照射された光を対物レンズ15に誘導する。また、ここで用いられる光源16の光、蛍光色素の発する蛍光、光源17の光の波長は互いに異なっているものを用いることが望ましい。151はバンドパスフィルターであり、光源16の光はこれを通過する

ことにより前記蛍光色素を励起するのに適当な波長に絞られる。対物レンズ15に誘導された励起光は集光され、基板1上に捕獲、固定された標的ポリヌクレオチドとともに結合した蛍光色素を励起する。励起された蛍光色素は、基板上的各領域のプローブに捕獲された標的ポリヌクレオチドの量に比例した強度の蛍光を発する。183はミラーであり、前記標的ポリヌクレオチドの量に比例した強度で発生された蛍光が再び対物レンズ15を介して集められた光を反射する。152はエミッションフィルターであり、検出したい蛍光の波長域の光のみを選択的に透過させるものである。191は検出器であり、エミッションフィルター152を透過した蛍光の強度を検出する。

【0015】したがって、対物レンズ15と基板1とを相対的に動かして、基板1の表面を対物レンズ15に誘導された励起光によって順次スキャンして、蛍光色素が発する蛍光強度の空間的な分布を蛍光像より知ることにより、基板に固定されたプローブに捕獲された試料溶液中の標的ポリヌクレオチドの量の空間的な分布を蛍光像として得ることができる。ここで標的ポリヌクレオチドの蛍光を観察する場合に用いる励起光は、標的ポリヌクレオチドとともに結合した蛍光色素を励起する場合には可視領域の波長の光で蛍光を発する蛍光色素を用いることが望ましい。標的ポリヌクレオチドとともに結合した蛍光色素による発光に代えて、標的ポリヌクレオチドの自家蛍光を観察することができる。この場合には励起光の波長として280nmから400nmの近紫外波長領域を用いることが望ましい。

【0016】前記蛍光色素の蛍光強度は、熱消光効果により、温度上昇の割合に応じて減少する。これを利用して、本実施例では基板上的標的ポリヌクレオチド捕獲領域の局所的な温度上昇を計測することができる。図2で示した装置では、検出器191で検出した標的ポリヌクレオチドとともに結合した蛍光色素の蛍光強度の変化を、解析装置192で蛍光強度変化の温度依存性をもとに解析し、標的ポリヌクレオチド捕獲領域の温度を見積もることができる。

【0017】赤外レーザー光源17で発生した赤外光は、ダイクロイックミラー182により下方に反射され、対物レンズ15により集光され、基板1上に形成された標的ポリヌクレオチド捕獲領域14に照射される。標的ポリヌクレオチド捕獲領域14では基板1の上に形成された薄膜層あるいは微粒子層が赤外光を吸収し、熱を発生するので試料溶液中の局所的な温度を上昇させることができる。対物レンズ15によって基板1表面で集束されるレーザー光源からの集束光の集束位置は、対物レンズ15を移動させるか、あるいは基板1を移動させることによって任意に決定できる。また捕獲されている標的ポリヌクレオチドの損傷を避けるため、標的ポリヌクレオチドが吸収を持つ波長領域の光を用いないことが

望ましい。たとえば波長800nm以上の近赤外光、波長400nm以上の可視光を用いるのがよい。

【0018】一般にDNAやRNAなどの一本鎖ポリヌクレオチドは、プローブなどの他の一本鎖ポリヌクレオチドと相補的關係がある時、水素結合による塩基対を形成して二本鎖ポリヌクレオチドを形成するが、試料溶液の温度を95℃程度以上に上昇させると、この水素結合に由来する核酸塩基対の二本鎖ポリヌクレオチドが解離し一本鎖ポリヌクレオチドになることが知られている。従って、基板上的特定の標的ポリヌクレオチド捕獲領域14に赤外集束光を照射し、その温度を95℃まで上昇させることにより、特定の標的ポリヌクレオチド捕獲領域でプローブに結合した標的ポリヌクレオチドを選択的に分離させることができる。

【0019】また、基板1上に面電極を配置して、この面電極と基板1との間に交流電場を印加すると、基板1上のプローブおよび基板1上の試料溶液中のポリヌクレオチドを伸長させることができる。その結果、プローブと試料溶液中のポリヌクレオチドの非特異結合を減少させるとともに、集束光によるプローブと標的ポリヌクレオチド対の解離を効果的に達成することができる。

【0020】また、プローブとハイブリダイズした標的ポリヌクレオチドの解離温度は、その結合した水素結合の量に比例して高くなるため、解離温度を調節することによって標的ポリヌクレオチドとプローブとの結合のマッチングの程度に応じた選択的なポリヌクレオチドの分取も可能である。すなわち、プローブに結合した標的ポリヌクレオチドは温度を徐々に上げて行くと水素結合が少ない標的ポリヌクレオチドから解離を始める。したがって、前記解析装置部192で得られた温度の情報をもとにレーザー光源17の出力を帰還制御し、標的ポリヌクレオチド捕獲領域14の温度を調節することによって、特異的結合の程度を勘案しながら選択的に標的ポリヌクレオチドを分取できる。

【0021】また、テトラエチルアンモニウムクロライド等の4級アンモニウム塩を試料溶液中加入することで、プローブに結合した標的ポリヌクレオチドの解離温度のばらつきをほぼそろえることも可能である。

【0022】図3に基板上的標的ポリヌクレオチド捕獲領域14の特定の領域を加熱する第1の手段を示す。本実施例では、基板ベース13は表面に配置された導電性膜131と熱伝導性絶縁基板132とより構成されている。導電性膜131上には、複数の標的ポリヌクレオチド捕獲領域141、142、143、144、145、146が配置されている。各標的ポリヌクレオチド捕獲領域は酸化アルミ薄膜などの光吸収層21と断熱層22の二層構造となっている。また、各標的ポリヌクレオチド捕獲領域の表面には、塩基長8-9塩基程度のプローブ（オリゴヌクレオチド）41、42、43、44、45、46が結合している。図では、これらのプローブの

内、プローブ41、42、43、46のみに、標的ポリヌクレオチド41'、42'、43'、46'が結合している状態を模式的に示している。したがって、標的ポリヌクレオチド捕獲領域を蛍光観察によって同定することで、試料溶液中のポリヌクレオチドのうち、プローブと結合した標的ポリヌクレオチドの対応を見積もることができる。図の例では、領域141、142、143、146ではプローブと標的ポリヌクレオチドが相補的結合をしているが、領域144、145では相補的結合がなされていない。このことより試料溶液中には領域144、145に配置されたプローブと相補的關係を持つポリヌクレオチドがないことがわかる。

【0023】つぎに、プローブ42に標的ポリヌクレオチド42'が結合している標的ポリヌクレオチド捕獲領域142に、対物レンズ15より集束光51を照射する。領域142の光吸収層21が集束光51を吸収し発熱する。領域142の光吸収層21の発熱により、領域142の近傍が95℃程度の高温になると、プローブ42と標的ポリヌクレオチド42'の間の水素結合がはずれ、領域142に捕獲されていた標的ポリヌクレオチド42'のみが選択的に基板1よりはずれる。このとき集束光の集光された領域の大きさが一つの標的ポリヌクレオチド捕獲領域の大きさより小さい場合は、この標的ポリヌクレオチド捕獲領域内に集光領域が収まるように光軸を調節すればよい。また、標的ポリヌクレオチド捕獲領域が集束光の集束領域より小さい場合には、各標的ポリヌクレオチド捕獲領域間の隙間を十分にとって、一つの領域のみが集束光によって加熱されるように、標的ポリヌクレオチド捕獲領域を配置することが望ましい。なお、本図では、図を見やすくするために、標的ポリヌクレオチド捕獲領域にプローブ1本のみを示したが、実際には、各領域とも同一の塩基配列を持ったプローブが複数固定されているのが普通である。

【0024】また、本実施例では基板ベース13表面に導電性膜131が配置されているから、上述したように、基板1の上面に対向する電極板（図示しない）を設け、両者の間に、交流電場を印加することでプローブやポリヌクレオチドを引き伸ばすことができる。これによって、結合時の誤った結合や、標的ポリヌクレオチド捕獲領域を加熱して標的ポリヌクレオチドをプローブから解離させるとき立体構造的な絡まり等を防ぎ、効率的に処理を行うことができる。

【0025】さらに基板ベース13に熱伝導性絶縁基板132を用いることで、集束光51を照射しない場合の冷却効果を改善することもできる。

【0026】本実施例での光吸収層21は蒸着によって作製してもよいが、塗布、散布によって作製してもよい。また標的ポリヌクレオチド捕獲領域の形状は、光リソグラフィのマスクを用いることで、正方形、長方形あるいは集束光の形状にあった円形あるいは楕円形の形状

をとってもよい。

【0027】図4に、基板1上の特定の領域を加熱する第2の手段を示す。図3の例では、光吸収特性を持った薄層21が標的ポリヌクレオチド捕獲領域に形成されていたが、本実施例では光吸収特性を持ち、かつ標的ポリヌクレオチド捕獲領域の大きさに比して十分に小さな光吸収特性を持った微粒子23が標的ポリヌクレオチド捕獲領域に分散して配置されている。微粒子は各領域に1個以上載っているものとする。本実施例でも、断熱層22を各領域に設けて、その上面に微粒子23を配置する。基板1が、導電性膜131と熱伝導性絶縁基板132とより構成されている基板ベース13から構成されている点は図3の例と同じである。

【0028】集束光51を特定の標的ポリヌクレオチド捕獲領域142に照射すると、領域中の微粒子23が光を吸収して発熱し、領域142の近傍のみ昇温させることができるから、表領域142の面のプローブに結合している標的ポリヌクレオチドのみを特異的にプローブから解離させることができる。この実施例では、微粒子23を用いることで、図3の例の集束光の集束範囲より小さな領域を特異的に加熱することが可能であるが、標的ポリヌクレオチド捕獲領域と集束光の集束領域の大きさの関係は図3の例と同じである。本実施例での微粒子23からなる光吸収層は微粒子の塗布、散布によって作製することができる。また形状についても、図3の例と同様、任意の形状がとれる。

【0029】図5に基板1上の特定の領域を加熱する第3の手段を示す。本実施例では、図4と同様に、集束光の波長領域に吸収を持つ微粒子24による昇温を利用するが、この微粒子24を集束光51によって、光ピンセットの要領で捕獲し、この捕獲した微粒子24をプローブと標的ポリヌクレオチドを解離させたい標的ポリヌクレオチド捕獲領域に配置する点において異なる。このとき、光ピンセットの特性より対物レンズ15の開口数は12以上であることが望ましい。なお、本実施例でも、断熱層22を各領域に設ける。基板1が、導電性膜131と熱伝導性絶縁基板132とより構成されている基板ベース13から構成されている点は図3の例と同じである。光ピンセットの要領で微粒子24を捕獲する点を除けば、図4と同様であるので、図に関するその他の説明は省略する。

【0030】本実施例では、微粒子24による昇温は、微粒子24が配置された領域の微粒子24の近傍のみであるから、標的ポリヌクレオチド捕獲領域の大きさと集束光の集束領域の大きさとは本質的に関係ない。すなわち、集束光の集束領域が複数の標的ポリヌクレオチド捕獲領域を覆う場合にも、微粒子24による昇温は微粒子24が配置された領域の微粒子24の近傍のみであるから、解離される標的ポリヌクレオチドは微粒子24が配置された標的ポリヌクレオチド捕獲領域のものにかぎら

れる。したがって、本実施例では、標的ポリヌクレオチド捕獲領域の密度を高くすることができるメリットがある。

【0031】図6に、図2で示した本実施例の基本構成を用いたポリヌクレオチド分離セル7の基板1との関係を中心としたより詳しい構造の例を示す。

【0032】この図ではポリヌクレオチド分離セル7の一部を内部が見えるように切り欠いて示している。また図7にこのポリヌクレオチド分離セルのA-A断面図を、図8にB-B断面図を示す。

【0033】ポリヌクレオチド分離セル7には、セル上板721、セル下板722と複数のスペーサー723によって仕切られた3つの試料溶液室731、732、733がある。セル上板721は光透過性の素材で作られている。3つの試料溶液室は、それぞれ、試料溶液出入り口711、712、713から試料溶液の出し入れを行うことができる。また、各試料溶液室間は連通孔714、715があり、この孔を通じて試料溶液の移動が行われる。図2で示したプローブが固定された基板1は、試料溶液室732のセル下板722上に固定されており、また基板1上には電場を印加する電極板131が組み込まれている。また、試料溶液室731、732、733それぞれの側壁面には電極751、752、754、755が付加されており、セル上板内面にも試料溶液室732の上方に電場が加えられるように、メッシュ状に電極753が配置されている。基板1の温度は放熱板33付きのペルチエ素子32、34、35によって0℃から95℃まで調節することができる。また試料溶液室731、732、733それぞれの温度をペルチエ素子32、34、35それぞれを独立に動作させることによって0℃から95℃まで調節することができ、各試料溶液室で他の部屋の温度を変化させることなくPCR反応を行ったり、変性反応を行うことが出来る。また対物レンズ15で観察する基板1の位置を移動させるために、セル7は治具741によってレール742、743、744上に固定されており、ステッピングモーター（図示しない）によって自在に2次元面上を移動させることができる。

【0034】図9A-Cに、図6-8で示したポリヌクレオチド分離セルを用いた核酸分離プロセスを説明するタイムテーブルを示す。まず試料溶液室731に導入されたポリヌクレオチドを含む試料溶液は図9Aに示されたような経時的な温度変化を20~30サイクル程度与えることで前処理としてのPCR増幅がなされる。すなわち、最初の変性の過程で二本鎖ポリヌクレオチドが一本鎖ポリヌクレオチドとされる。次いで、試料溶液中のプローブとのアニーリング、これに続くポリメラーゼ伸長反応を行わせて、ポリヌクレオチドを倍増する過程を繰り返し行う。この時の温度制御はペルチエ素子32によって行われ、試料溶液室731内の試料溶液全体に対

して行われるものである。つぎに、増幅されたポリヌクレオチドを含む試料溶液は、図9Bに示されるような過程で特定の塩基配列を持ったポリヌクレオチドのみが分離される。すなわち、試料溶液導入過程では電極751、755を陰極に、電極754と基板1上の電極を陽極にして、試料溶液室731の試料溶液中のポリヌクレオチドを試料溶液室732に誘導する。次にペルチエ素子34によって試料溶液室732内の試料溶液を95℃まで加熱し試料溶液中のポリヌクレオチドの水素結合をはずし、一本鎖とする。次に37℃まで温度を下げて基板1上の標的ポリヌクレオチド捕獲領域のプローブとの結合を行わせる。そして、捕獲領域のプローブと結合しなかった試料溶液中のポリヌクレオチドを、今度は電極751を陽極とすることで再び試料溶液室731に戻す。つぎに蛍光観察技術によって基板1上のどの領域に標的オリゴヌクレオチドが結合したか確認する。そして標的ポリヌクレオチドが基板1上のプローブと結合した領域の情報（図2の蛍光の強度検出器191の出力）を基に、基板1上の一つの標的ポリヌクレオチド捕獲領域に集束光を照射することでその領域でプローブと結合した標的ポリヌクレオチドをプローブからはずすことができる。このとき電極753と基板1表面の電極131との間で交流電場を発生させて標的ポリヌクレオチドを伸長させておく。さらにレンズ15から集束光51を与えて、基板1上の特定の標的ポリヌクレオチド捕獲領域の標的ポリヌクレオチドのみをプローブから解離させながら電極755を陽極とすることで試料溶液室733に目的とする標的ポリヌクレオチドのみを導入する。このとき、電極751を陽極に保ち、電極752を陰極にすることで、試料溶液室731にある試料溶液中のプローブと結合しなかったポリヌクレオチドは、試料溶液室731に保持され、試料溶液室732あるいは733に移動することはない。さらに、電極に電場を加えつつづながら溶液出入り口713より試料溶液室733にPCRに必要な成分を導入する。その後、図9Cで示した後処理PCRをペルチエ素子35によって20~30サイクル程度行うことで試料溶液室733に導入された試料溶液から希望するポリヌクレオチドを選択的に高精度にかつ高速に分離、回収、増幅することができる。また、一度、試料溶液室733の増幅された試料溶液を回収した後、基板1を移動させて、基板1上の他の標的ポリヌクレオチド捕獲領域に対して、再び同様に図9Bで示された分離過程、図9Cで示された後処理PCR過程を繰り返し、順次、基板1の各標的ポリヌクレオチド捕獲領域に捕獲されたポリヌクレオチドを選択回収、増幅することができる。

【0035】なお、図9A-Cで説明したタイムスケジュールでは、温度の低下については特別な操作をすることを説明しなかったが、たとえば、図6のペルチエ素子32、34および35を積極的に放熱に使用よるしてそ

それぞれの部屋全体の冷却を短時間で行うことができる。また、標的ポリヌクレオチド捕獲領域のブロープに結合しているポリヌクレオチドを解離させるための局所変性後の冷却のために、各に標的ポリヌクレオチド捕獲領域毎にペルチェ素子を設けることが可能であることは言うまでもなからう。

【0036】実施例Ⅰ

本実施例は、実施例Ⅰがブロープと結合した標的ポリヌクレオチドを解離させるために、各標的ポリヌクレオチド捕獲領域の温度制御を収束光照射によって行ったのに代えて、基板1に埋め込まれた発熱体を利用する構造とした点において異なるのみで、その他の点においては本質的に同じである。以下図10-15を参照しながら説明する。

【0037】図10は本発明の第2の実施例の標的ポリヌクレオチド捕獲領域を持つ基板1と標的ポリヌクレオチド捕獲領域における捕獲状態を検知するための光学系との関係を示す図である。図10と図2、3と対照して明らかなように、本実施例では、基板1は、表面に標的ポリヌクレオチド捕獲領域を配置する導電性膜131、次いで、温度制御部133と熱伝導性絶縁基板132とよりなる基板ベース13から構成されている。また、導電性膜131の表面には、複数の標的ポリヌクレオチド捕獲領域141、142、143、144、145、146が配置されるとともに、温度制御部133の内部には各標的ポリヌクレオチド捕獲領域を独立に温度制御するための電極およびこれによって発熱させられる発熱体が埋め込まれている。各標的ポリヌクレオチド捕獲領域は酸化アルミ薄層などのブロープ結合層221と電気的な絶縁体層222の二層構造となっている。さらに、各標的ポリヌクレオチド捕獲領域の表面には、塩基長8-9塩基程度のブロープ（オリゴヌクレオチド）41、42、43、44、45、46が結合している。図では、これらのブロープの内、ブロープ41、42、43、46のみに、これらと相補的な関係を持つ標的ポリヌクレオチド41'、42'、43'、46'が結合している状態を模式的に示している。

【0038】また、本実施例でも、標的ポリヌクレオチド41'、42'、43'、46'がブロープ41、42、43、46と結合するとき蛍光色素を同時に結合する構成としたときは、蛍光色素を励起して、これが発する蛍光を検知して、各領域についてのブロープと標的ポリヌクレオチドとの結合の程度を蛍光強度より見積もることができる。さらに、温度上昇による熱消光効果により蛍光色素の蛍光強度が温度上昇の割合に応じて減少することを利用して、標的ポリヌクレオチド捕獲領域の局所的な温度上昇を計測することができる。また、蛍光色素の蛍光強度の変化を、蛍光強度変化の温度依存性をもとに解析し標的ポリヌクレオチド捕獲領域の温度を見積もることができる。なお、本実施例でも実施例Ⅰと同じ

物または均等物には同じ参照符号を付した。

【0039】図11に、図10に示す基板1のA-A断面図を示す。基板1は熱伝導性絶縁基板132、温度制御部133および導電性膜131が積層された構造である。最上層の導電性膜131の表面には標的ポリヌクレオチド捕獲領域となるブロープ結合層221と電気的な絶縁体層222の二層構造が形成されている。温度制御部133には面電極226の層、発熱体225の層および面電極224の層が形成されている。面電極226の層と面電極224の層のそれぞれの電極はマトリックス状に交差する形であり、この交差する位置が各発熱体225の位置に対応するとともに各標的ポリヌクレオチド捕獲領域の位置と対応するように形成されている。熱伝導性絶縁基板132には、各標的ポリヌクレオチド捕獲領域に対応して温度計測用のサーミスタ231の層が埋め込まれており、各標的ポリヌクレオチド捕獲領域の温度を計測することができる。

【0040】図12A-図12Cに、第2の実施例の基板1の温度制御部133のB-B断面、C-C断面およびD-D断面の断面図を示す。面電極226と面電極224は直交する形であり、この交差点に発熱体層225を挟み込んでいる。従って面電極226と面電極224とに電位差を与えて電流を流すと、この交差点にある発熱体225のみが発熱する。すなわち、面電極226と面電極224とを適当に選択して電位差を与えるとこの交差点に対応する位置の標的ポリヌクレオチド捕獲領域の温度をあげることができる。

【0041】図10に示す基板1を前述した図6-8に示したポリヌクレオチド分離セル7の基板1として置換することができるが、ここでは、もっとシンプルな例を説明する。

【0042】図13に第2の実施例のポリヌクレオチド分離セル251とその関連装置のブロック図を示す。図14に第2の実施例のポリヌクレオチド分離セル251のG-G断面図を示す。ポリヌクレオチド分離セル251は光透過性を持った容器によって作られておりセル内の基板1を光学的に観察することができる。セル251にはポリヌクレオチドを含む試料を注入する試料溶液注入管252と、基板1の特定の標的ポリヌクレオチド捕獲領域で捕獲された標的ポリヌクレオチドを取り出す取り出し管253が接合しており矢印57、58の方向に前記溶液を流すことができる。またセル251内上面には透明電極（図示しない）が配置されており、基板1の導電性膜131との間に電位差を持たせることができる。特定の標的ポリヌクレオチド捕獲領域に対応する発熱体を発熱させたり、標的ポリヌクレオチド捕獲領域に直流電場あるいは交流電場を発生させるために、本実施例は直流電源254、交流電源255、制御回路256を持っており、後に示す手順に従って、サーミスタ231からの温度情報をもとに基板1の状態を制御すること

ができる。

【0043】図15に第2の実施例のポリヌクレオチド分離セルの分離プロセスを説明するタイムテーブルを示す。

【0044】セル251に導入された試料は、図15に示されるような過程で特定の塩基配列を持ったポリヌクレオチドのみが分離される。

【0045】(1) 試料溶液の導入過程では基板1の導電性膜131を陽極に、セル上面の透明電極を陰極にして、溶液中のポリヌクレオチドを基板1の表面に誘導する。また、基板1の導電性膜131とセル上面の透明電極との間で交流電場を発生させることでポリヌクレオチドを伸長させてもよい。この状態では、温度制御部133中のすべての電極224、226を導通させ、すべての発熱体225を発熱させ、基板1の表層の温度を95℃まで上昇させる。

【0046】(2) 次に37℃まで温度を低下させる。これで標的ポリヌクレオチド捕獲領域に固定されたプローブと試料溶液中の標的ポリヌクレオチドは結合する。

【0047】(3) つぎに、基板1の表層を72℃程度まで上昇させ、基板1の導電性膜131を陰極に、セル上面の透明電極を陽極にして非特異的にプローブに結合したポリヌクレオチドを試料溶液とともに除去する。

【0048】(4) セル251中の溶液を交換した後、温度制御部133中の電極224、226のそれぞれ一つを導通させ、発熱体225の一つを発熱させ、標的ポリヌクレオチド捕獲領域の一つを95℃まで昇温させ、この領域のプローブと結合している標的ポリヌクレオチドを解離させ溶液とともに回収する。

【0049】(5) 同様な手順を各標的ポリヌクレオチド捕獲領域について行うことで、各領域のプローブに結合した標的ポリヌクレオチドを順次取り出すことができる。

【0050】この場合、実施例Iで説明したと同様に、あらかじめ、各標的ポリヌクレオチド捕獲領域についての標的ポリヌクレオチドの結合状況を検出器191、解析装置192からの温度情報をもとに検出して、回収したいポリヌクレオチドの結合している標的ポリヌクレオチド捕獲領域についてのみ、上述の温度制御を行うものとすれば、処理効率を上げることができる。

【0051】実施例II

第3の実施例は、プローブを安定に固定するように工夫された標的ポリヌクレオチド捕獲領域を持つ基板1の構成に関するものである。具体的には、捕獲領域の表面を酸化膜層とした金属膜とするとともに、シランカップリング反応でプローブを安定に固定できる構造とした基板1を提案するものである。

【0052】本実施例による基板1の製作手順を説明する。厚さ0.4mmで24mm角のガラス基板を用意してNaOH(1M)溶液に浸し、30分間超音波洗浄す

る。超純水で流水洗浄した後、110℃15分間ベークする。真空蒸着装置を用いてクロム(Cr)を蒸着する。厚みは3nmである。エタノールで洗浄する。3-グリシドキシプロピルトリメトキシシランの原液に5分間浸漬した後、50%のエタノール溶媒に溶解した4%の3-グリシドキシプロピルトリメトキシシランの溶液に30分間浸し、時々攪拌する。溶液から取り出して、110℃で30分間ベークし、シランカップリング試薬で金属表面にグリシドキシ基を導入して基板1を得る。

【0053】図16は第3の実施例による基板1でプローブを安定に固定できた様子を示す図である。本実施例の基板1はガラス基板302の表面にCr層303が蒸着されさらにその表面が酸化膜304になっている。シランカップリング層305によりプローブが固定されている。プローブを安定に固定できることを確認するために、本実施例では、標的ポリヌクレオチド捕獲領域306および307のそれぞれに、シランカップリング層305を介して固定されたプローブ311および312に末端が蛍光色素スルフォラダミン101で標識された521bpおよび625bpの長さのポリヌクレオチドをそれぞれ結合させた。

【0054】本実施例による基板1の効果を確認するために行った比較実験の結果について説明する。

【0055】まず、本実施例の構成の基板、Crに代えてアルミニウム(Al)をガラス302の表面に蒸着した基板およびガラス302の表面に直接シランカップリング処理した基板のそれぞれについて比較する。本実施例の構成の基板としてCrをガラス302の表面の全面にわたって54nm蒸着した二つの基板を調製した。600nm~800nmの光透過率は53~56%であった。Crに代えてAlをガラス302の表面の全面にわたって蒸着した基板のAl膜の厚さは15nmのものを用意した。製作の手順は本実施例と同じである。この基板の600nm~800nmの光透過率は19~25%であった。金属膜を蒸着しないガラス自体の600nm~800nmの光透過率はほぼ84%である。この程度の透過率であれば、蛍光色素、たとえば、スルホラダミン101(吸収極大594nm、蛍光615nm)で標識した標的ポリヌクレオチドを励起光アルゴン(Ar、514nm)やヘリウム-ネオン(He-Ne、545nm)で励起することによる蛍光でプローブに捕獲された標的ポリヌクレオチドを検出することができる。

【0056】図17(A)から図17(C)は第3の実施例の基板による効果を確認する実験結果を説明する図である。

【0057】図17(A)はCrを54nm蒸着した第3の実施例の基板、図17(B)はCrに代えてAlを15nmの厚みに蒸着した基板、図17(C)は金属蒸着膜を持たない基板のそれぞれについて、シランカップリング層305を介して固定されたプローブ311およ

び312に末端が蛍光色素スルフォローダミン101で標識された521bpおよび625bpの長さのポリヌクレオチドをそれぞれ結合させる処理を行った。この状態でレーザー共焦点顕微鏡でスキャンした結果を相対蛍光強度および透過率について測定した結果を示す。横軸に基板上的スキャン位置を、縦軸に実線330はレーザー顕微鏡で検出される蛍光(580nm以上)分布と透過光強度分布をそれぞれ示す図である。波線331は380nmから450nmの透過率分布を示す。

【0058】図17(A)から分かるように、本実施例の基板では、蛍光色素スルフォローダミン101で標識されたポリヌクレオチドが結合している領域CA全域にわたって一定の蛍光強度330が得られた。他の部分からの蛍光強度330は十分低い。また、380nmから450nmの透過率は、いずれの部位においてもほぼ一定である。このことは、プローブの固定から標的ポリヌクレオチドの結合までの種々の反応操作においてCr層が安定に保持されており、ガラス302の表面からの剥離が無いことを示している。

【0059】図17(B)から分かるように、Crに代えてAlを蒸着した基板では、蛍光色素スルフォローダミン101で標識されたポリヌクレオチドが結合している筈の領域CAの透過率が顕著に高くなっている。これは、プローブの固定反応においてAl蒸着面が溶解していることを意味する。Al蒸着面はDNAやRNAを溶解させる一般的な溶液である10mMトリス塩酸-1mMEDTA緩衝液(pH7.5)で溶解してしまう結果が得られ、Alを蒸着した基板は水溶液を用いる反応系には利用できないことがわかる。この結果、プローブの固定は実質的に出来ておらず、したがって、蛍光色素スルフォローダミン101で標識されたポリヌクレオチドの結合もなく、全体に蛍光強度330は十分低い。

【0060】図17(C)から分かるように、ガラス表面を直接シランカップリング反応させてプローブを固定した基板では、蛍光色素スルフォローダミン101で標識されたポリヌクレオチドが結合している領域CAが他のプローブを固定していない部分より蛍光強度330が高くなっているから、プローブを固定する機能を果たすことが出来ていることはわかる。しかし、本実施例の基板と比較して蛍光強度330が場所によってバラ付いている。これはプローブが均一に固定されていないことを示唆するものである。

【0061】これらの結果から明らかなように、Crを蒸着した本実施例による基板がプローブを安定に保持し標的ポリヌクレオチドを捕獲するのに有利であることが分かる。なお、Crに限らず弱アルカリ溶液に安定な金属で数nmから10nmの厚さに、ガラス基板に蒸着したものが優れていることがわかる。具体的には、表面が酸化膜で覆われ、95℃の弱アルカリ溶液に溶解しづらいものであれば良いが、金や白金は酸化膜を作らないた

めシランカップリング反応を行うことができないので利用できない。ステンレスは、弱アルカリに安定で、酸化膜を形成するなど、Crと良く似た性質をもつ。しかし、理由はわからないがシランカップリング反応を用いた活性残基の導入ができないので除外する。同様な検討から少なくともTi、V、Cr、Fe、Co、Ni、Mo、W、のいずれかの金属が有効であることがわかっている。

【0062】次に、図18(A)、図18(B)を参照して、本実施例による基板によってプローブに捕獲された標的ポリヌクレオチドを効果的に解離させ回収することについて説明する。図18(A)および図18

(B)は図16に示した領域306および307のそれぞれに、シランカップリング層305を介して固定されたプローブに捕獲された5'末端がスルフォローダミン101で標識された521bpおよび625bpのポリヌクレオチドについての実験結果である。基板表面は20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)20マイクロリットルで覆われている。

【0063】図18(A)および図18(B)はそれぞれの領域306および307を、それぞれの領域をまたいでレーザースキャンニング(514nm)を行い、蛍光検出(510nm~580nm)した結果を示す。横軸に基板上的スキャン位置を、縦軸にレーザー顕微鏡で検出される相対蛍光強度分布を示す。335は相対蛍光強度を示す線であり、領域306および307のいずれも全域にわたってほぼ一定の蛍光が検出される。次に領域306のみ1053nmのYAGレーザー10mW(スポット径5nm)でスキャンニングする。その結果、図18(A)では破線336に示すように、スキャンニング後の相対蛍光強度分布はYAGレーザーによるスキャンニングの部位333では相対蛍光強度が約1/10に低下していた。領域307については、相対蛍光強度335、336ともに変化はない。

【0064】図19は本実施例によるポリヌクレオチドの分取について説明する電気泳動の結果を模式的に示す図である。

【0065】340はマーカーのレーンである。341と342は基板1の領域306と307で捕獲したポリヌクレオチドと同じ物を準備して電気泳動で測定した結果を示すレーンである。それぞれ、521bpと625bpのバンドが明瞭に現われている。343および344は、基板1の領域306を1053nmのYAGレーザー10mW(スポット径5nm)でスキャンニングした後の基板1の表面の緩衝液を回収しPCR増幅し、PCR増幅産物を2%アガロースゲル電気泳動で測定した結果を示すレーンである。レーン343には521bpのバンドが明瞭に検出されが、レーン344には625bpのバンドが表れていない。このことは、回収された緩衝液をPCR増幅した溶液中にはYAGレーザー10m

W (スポット径5 nm) でスキャンした領域306から解離されたポリヌクレオチドのみが存在していたことを示す。本実施例によれば、ブロープの固定および捕獲したポリヌクレオチドの効果的な分取ができる。

【0066】実施例IV

上述の実施例I-IIIが基板1が平面であったのに対し、第4の実施例では、細管の内面を利用する構造として、ポリヌクレオチドの分取に必要な試料溶液の量を低減する。

【0067】図20および図21は第4の実施例で採用できる細管の外面およびA-A断面図である。

【0068】401は細管であり、ガラス細管等の光透過性の細管である。412は管壁であり、この内面にはクロム等の実施例IIIで示した金属からなる管内被覆413が施されている。この被覆面の表面は金属の空気酸化によって生じた安定酸化物となっている。被覆面上に円筒状にブロープが固定された標的ポリヌクレオチド捕獲領域414、415が配置されている。各標的ポリヌクレオチド捕獲領域414、415、には、各領域固有のブロープが密に固定されており、試料溶液中のポリヌクレオチドのうちこれらと相補的なポリヌクレオチドのみをそれぞれの領域に捕獲することができる。また、細管401の外面にはマーカー411が内面の各標的ポリヌクレオチド捕獲領域の境界位置に記されており、細管外面から各標的ポリヌクレオチド捕獲領域の位置を確認することができる。

【0069】図22は標的ポリヌクレオチド捕獲領域にブロープを固定するための構造の例を説明する図である。

【0070】実際、図21で示したように同心円状に独立したオリゴヌクレオチドのブロープ層を細管内面に形成するには、たとえば以下のような手法を用いる。まず、細管401の管内全域をシラノール基とエポキシ基を両端に持つ二価性試薬と反応させることでエポキシ基416を管内表面の全領域に生やす。すると管内壁は撥水性を持つようになり試料水溶液を弾くようになる。つぎに特定の領域415の表面に結合させたい核酸試料溶液を液滴の形態で管401内に導入する。すると管内壁は撥水性を持つため液は球状となり管内壁と最小限の接触面積で同心円状に接触する。この液滴を領域415まで誘導し、しばらく放置することで所定の領域のみで前記エポキシ基416の自由端と5末端をアミノ基修飾した核酸ブロープとを結合させる。反応させた核酸ブロープを含む試料液滴は反応後すみやかに細管401から取り出す。同様に異なる試料液滴を導入して別の領域で反応させることを繰り返すことで図21に示したような構造を形成することができる。

【0071】この第4の実施例により試料溶液中の標的ポリヌクレオチドを分取するためのタイムテーブルは、図15に示す図と同じであるので、説明は省略する。

【0072】図23は第4の実施例のポリヌクレオチド分離装置の全体構成を示す図である。431はポリヌクレオチド分離モジュールであり、内部に図20および図21で説明した細管401が組み込まれている。細管401の両端は細管接合部432、433に接合されている。容器434に保持された試料溶液、容器435に保持された洗浄液、容器436に保持された洗浄液およびエアフィルタ437を通過した空気がセクタ438によって選択され、ポンプ439によって細管接合部432に導入される。400はコントローラーであり、本実施例の装置のコントロールおよび電源供給手段を代表して示すものである。ポリヌクレオチド分離モジュール431より排出された溶液は、細管接合部433を通過して、PCR増幅等の後処理プロセス441へ送られる。コントローラー400には装置の各部から必要なデータが集められ、これに応じて各部に必要な操作信号が送出されるわけであるが、これらの具体的な構成と装置各部との接続については詳細を省略する。上述のタイムテーブルおよび以下の説明によって当業者が容易に実現できる。

【0073】図24は第4の実施例のポリヌクレオチド分離モジュール431のB-B断面を示す図である。モジュール431内には、細管401の管壁に光を導入する光源442、細管401の各標的ポリヌクレオチド捕獲領域に対応してドーナツ状の発熱源443、細管より内面へプラズモン励起された励起光によって励起された標的ポリヌクレオチド捕獲領域の蛍光あるいは細管表面のマーカー411を検出する光検出ブロープ444および細管の温度を検出する熱検出ブロープ445が並列に配置されている。また、細管接合部432、433内にはそれぞれ電極451、452が配置されており、細管401内の試料溶液成分を電気泳動によって回収することができる。また電極コネクタ453によって細管401の内面被覆413に電位を与えることができ、これによって細管内面の表面から核酸成分を遠ざけたり引き寄せたりすることができる。

【0074】図25は図24に示した実施例のポリヌクレオチド分離モジュール431の変形例を示す図である。本例では基本構成は図24に示した実施例と同じであるが、分離されたポリヌクレオチドを回収するときに導入する洗浄液を液滴471にしたところが異なる。図23に示したセクタ438を調節することで、細管401内にタンク436の洗浄液の液滴471を導入した後、エアフィルタ437を通過した空気によって液滴471を押し出し、回収したい標的ポリヌクレオチド捕獲領域まで進ませ、液滴471がその領域を覆うようにする。次にリークバルブ461、462を開放させ発熱源443による局所発熱によって膨張した細管401内の空気を逃がすことで、液滴471の位置が移動しないようにする。その後、その領域の温度を解離温度以上に上

げてブローブから標的ポリヌクレオチドを解離させる。次いで、リークバルブ461、462を閉じ、エアフィルタ437を通過した空気によって液滴471を細管接合部433まで押し出し標的ポリヌクレオチドを回収する。本例の場合、液滴が接するのは特定の標的ポリヌクレオチド捕獲領域であるため、仮に、他の領域の温度が解離温度に達したとしても、液滴中に混入することがなく、より高精度に分離された回収を行うことができる。また、本例では発熱はポリヌクレオチド分離モジュール431内の発熱源443による局所発熱としたが、標的ポリヌクレオチド捕獲領域全体を覆う形状の一つの発熱源を用いる場合にも、同様に高精度の分離、回収が出来る。

【0075】図26は図24に示した実施例のポリヌクレオチド分離モジュール431の変形例を示す図である。本例では、細管401の内部に設けられた光源442、発熱源443、光検出ブローブ444および熱検出ブローブ445を省略し、これに代わる光学系を細管401の外部に設けたものである。すなわち、実施例Iの実施例である図2、6に示す構造で基板1に代えて細管401を利用した形である。したがって図2の光学系と同じ物が使えるが、図では簡略化するため対物レンズ15のみを示した。

【0076】細管接合部432、433に接合された細管401をレール446上で移動させ、対物レンズ15により所定のポリヌクレオチド捕獲領域の細管内の状態を観察すると同時に集束光を細管の前記領域に照射することによって、細管内の集束点近傍のみを局所加熱することができる。この時、細管を円周方向に回転することのできる構造とすれば、細管内の円周面方向の領域全体のポリヌクレオチドの捕獲状況を観察、加熱し回収することができる。

【0077】図27は図26に示した実施例のポリヌクレオチド分離モジュール431の変形例を示す図である。本例は、細管401の外部に光学系を設けたものである点については図26と同じであるが、細管内部の各標的ポリヌクレオチド捕獲領域に設けたと同じ光学系を一組だけ細管外部に配置したモジュール431として、これを細管401に対してレール481上を移動させる構造とした点において異なる。これにより、装置を全体的に小型化できる。

【0078】実施例 V

上記実施例I～IVにおいては、標的ポリヌクレオチドが試料溶液の中にある場合であったが、本実施例は、細胞自体から、直接、標的ポリヌクレオチドを分取することを狙いとするものである。もちろん、本実施例でも、結局はポリヌクレオチドを含む試料溶液の形になった状態で分取するわけであるが、標的ポリヌクレオチド捕獲領域に細胞を導入した上で試料溶液の形にするものである。試料溶液中の標的ポリヌクレオチドの存在比率

が高いものとなり、前処理としてのPCR等を省略できるケースが増加する。また、本実施例によれば、細胞毎に細胞の核酸、蛋白質などの内容物を得ることもできる。

【0079】図28は本実施例の基本要素を示す図である。

【0080】1は基板であり、その表面に、先の実施例で説明したのと同様の標的ポリヌクレオチド捕獲領域511が形成されている。521はコントローラーであり、標的ポリヌクレオチド捕獲領域511に細胞561を捕獲固定するために、捕獲領域511の電極と、基板1に対向して設けられた接地電極514との間に直流あるいは交流電場を印加する。526は直流あるいは交流電場を印加しあるいは接地するための電源回路、525は選択スイッチである。512はペルチエ素子、513は温度センサーであり、各標的ポリヌクレオチド捕獲領域に近接して基板1内に埋め込まれている。523は温度計測および制御部であり、温度センサー513の信号を入力するとともに、ペルチエ素子512により、各標的ポリヌクレオチド捕獲領域を独立してその表面温度を制御する。どの領域の温度を制御するかはコントローラー521からの指示による。

【0081】図29は図28で説明した基本要素を持つポリヌクレオチド分離セルと光学系を組み合わせた本実施例の基本構成を示す図である。図30は図29で説明した分離セルのA-A断面を示す図である。

【0082】541はポリヌクレオチド分離セルであり、542および543は試料導入管および試料排出管であり、これらを通じて細胞試料、あるいは洗浄液等が分離セルに導入され、また分離セルより細胞残骸、蛋白質、精製した核酸試料等が回収される。分離セル541の内部には図30に示すように、基板1上に標的ポリヌクレオチド捕獲領域が形成されるとともに、本実施例では、試料導入管542から導入された細胞試料を標的ポリヌクレオチド捕獲領域に導くための電極551、552、553、―――が配列され、これらに配線が接続されている。この図では上部電極514は表れない。各標的ポリヌクレオチド捕獲領域には、それぞれの標的ポリヌクレオチドと相補的な一本鎖オリゴヌクレオチドであるブローブが固定されている。

【0083】ポリヌクレオチド分離セル541の内部は図2で説明したのと同じ光学系で監視できる。すなわち、前記基板1を対物レンズ15の光軸に対して垂直に配置し、蛍光観察用光源16からの励起光をバンドパスフィルター151、ダイクロイックミラー181を介して対物レンズ15に誘導する。対物レンズ15に誘導された励起光によって、基板1上に捕獲、固定された標的ポリヌクレオチドとともに結合した蛍光色素は励起され、励起された蛍光色素は、基板上の各領域のブローブに捕獲された標的ポリヌクレオチドの量に比例した強度

の蛍光を発する。前記標的ポリヌクレオチドの量に比例した強度で発生された蛍光が再び対物レンズ15を介して集められ、エミッションフィルター152を介して、検出したい蛍光の波長域の光のみを選択的に検出器191に導入して分離セル541の内部を知ることができる。

【0084】一般に、細胞は加熱することにより細胞膜の一部が破れ核酸、蛋白質などの内容物の遊離が見られる。したがって、細胞を含む試料溶液をポリヌクレオチド分離セル541に導入した後、基板1上の特定の標的ポリヌクレオチド捕獲領域の温度を95℃まで上昇させることにより、その領域にある細胞を破壊して内容物を遊離させるとともに、二本鎖ポリヌクレオチドを一本鎖ポリヌクレオチドに解離させることができる。その後、この捕獲領域の温度を37℃まで下げると、これらの標的ポリヌクレオチドの内その領域のプローブと相補的な一本鎖ポリヌクレオチドをプローブに捕獲することができる。特定の捕獲領域の温度を制御するためには、この領域に対応するペルチエ素子512を選択して電流を流せば良い。

【0085】以下図31(A)－図31(E)および図32(A)－図32(D)を参照して本実施例によって血液細胞から直接に細胞の内容物および標的ポリヌクレオチドを分取する方法を説明する。

【0086】まず、血液試料のイオン強度を低下させ、赤血球を破壊し、血液試料中の細胞が白血球のみになるように調製する。図31(A)は基板1の表面に標的ポリヌクレオチド捕獲領域551、552、553……が形成されている状態を示す図である。図31(B)はポリヌクレオチド分離セル541に血液試料がセル内に導入され白血球561が基板1の表面上を漂遊している状態を示す図である。この状態で、標的ポリヌクレオチド捕獲領域551、552、553……の電極と電極514との間に交流電場を印加し、白血球561を標的ポリヌクレオチド捕獲領域に引き寄せる。このときは電極514と各標的ポリヌクレオチド捕獲領域の電極間に生ずる電場密度の勾配が、各標的ポリヌクレオチド捕獲領域において密となる。また、この時用いる交流電場としては周波数1kHz以上、10V/mm以上が望ましい。図31(C)は交流電場によって白血球が標的ポリヌクレオチド捕獲領域に引き寄せられ、各領域に白血球が配置された状態を示す図である。この状態で、蛍光標識した抗原物質をセル541内に導入する。図31

(D)は抗原物質に対して抗体反応する白血球(図にハッチングを付した白血球562、563)のみが標識された蛍光を発する様になった状態を示す図である。ただし、このとき基板表面の温度は4℃程度に冷却し、細胞中のmRNA等の量がマーカー抗原との結合によって変化しないように制御することが望ましい。温度が低下した場合でもB細胞等の表面に存在する抗体部の結合能に

顕著な差は見られない。そこで、図29で説明した光学系により、蛍光を発する白血球のある標的ポリヌクレオチド捕獲領域の位置を検出器191の出力により同定することができる。この後、これらを一つずつ順番に加熱し、破壊することで、前記抗原物質と反応性をもつ細胞の内容物を試料溶液中に遊離させることが出来る。図31(E)は各領域に固定された白血球のうち白血球563のみが破壊された結果、これが基板1上から無くなった状態を示す図である。したがって、この状態で、交流電場を他の細胞には印加したままで、ポリヌクレオチド分離セル541中の試料溶液を回収すれば特定の白血球中の内容物を取り出すことが出来る。

【0087】図32(A)は標的ポリヌクレオチド捕獲領域の一つ616にプローブ671が固定されている状態を示す図である。図32(B)は、上述のようにして、該捕獲領域616に白血球662が誘引され、捕獲された状態を示す図である。このように白血球662が捕獲領域616に誘引された後、試料溶液を交換し、このpHを4程度まで低下させる。これは、蛋白質のpK値がほぼ4以上であり、pHを4以下にすることで蛋白質が持つ総電荷が正となり、ポリヌクレオチドが持つ電荷が負であることから容易に直流電場中で分離することが出来るためである。このようなpH条件下でペルチエ素子512によって捕獲領域616の温度を上げ、白血球を破壊する。そこで、標的ポリヌクレオチド捕獲領域616の電極を陽極、対向する面の電極514を陰極とすると、ポリヌクレオチド664は捕獲領域616に集まり、蛋白質663は対向する電極514の面に電気泳動される。図32(C)は、ポリヌクレオチド664および蛋白質663が電気泳動により移動する様子を模式的に示す図である。この状態で容器内の溶液を交換することで、蛋白質とポリヌクレオチドを簡単に分離することが出来る。なお、この時、当然のことながら、標的ポリヌクレオチド捕獲領域に固定されているプローブ671と相補的なポリヌクレオチドはこれと結合する。

【0088】次に、標的ポリヌクレオチド捕獲領域の電極を陰極、対向する電極514を陽極とすると、捕獲領域616上でプローブ671に結合した標的ポリヌクレオチド666は領域616上に残るが、結合しなかったポリヌクレオチドは試料溶液中に遊離する。したがって、この時の試料溶液を回収すると、白血球662中のポリヌクレオチドの内、プローブ671と結合しなかったものを溶液中に回収することが出来る。図32(D)は、プローブ671に結合しなかったポリヌクレオチド665が電気泳動により移動する様子を模式的に示す図である。

【0089】最後に、特定の標的ポリヌクレオチド捕獲領域の温度を95℃程度まで上昇させることで、その領域のプローブに結合した特定の標的ポリヌクレオチドが遊離することから、この時の試料溶液を回収することで

目的とした mRNA などの標的ポリヌクレオチドを回収することが出来る。

【0090】一つの白血球について本手順を終了した後、同様に次の白血球に付いて同じ手順をとれば、順次 1 白血球ずつ目的とする mRNA 等の標的ポリヌクレオチドを回収することができる。また、マーカー標識による染色で、異なる 2 種類以上のマーカーで染色し、異なるフィルターで観察することで、複数の条件に合致する細胞を選択し、回収してもよい。

【0091】また、標的ポリヌクレオチド捕獲領域のプローブに標的ポリヌクレオチドが結合した状態で、標的ポリヌクレオチドの総量を、光学系の信号により、定量的に測定することが出来る。したがって、本実施例は、B 細胞等の白血球中の mRNA の総量を検査することにも応用でき、特定の抗原に対して反応性を持った白血球の活性を見積もることにより、高速かつ簡便に病状を知ることにも出来る。

【0092】もちろん、この実施例が白血球に限らず、任意の細胞について行えるものであることは言うまでもない。

【0093】

【発明の効果】本発明によれば、効率良く且つ高精度に標的ポリヌクレオチドを分取できる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明のポリヌクレオチド分離方法および装置が遺伝子の解析および選択的な回収処理の中で占める位置を説明するための遺伝子処理のフロー図である。

【図 2】本発明の第 1 の実施例の基本構成を示す模式図である。

【図 3】第 1 の実施例の基板上的特定の領域を加熱する第 1 の手段を示す模式図である。

【図 4】第 1 の実施例の基板上的特定の領域を加熱する第 2 の手段を示す模式図である。

【図 5】第 1 の実施例の基板上的特定の領域を加熱する第 3 の手段を示す模式図である。

【図 6】第 1 の実施例のポリヌクレオチド分離セルの具体的な構造を示す模式図である。

【図 7】図 6 で示したセルの A-A 断面図である。

【図 8】図 6 で示したセルの B-B 断面図である。

【図 9】A-C は本発明の第 1 の実施例の核酸分離プロセスを示すタイムテーブルである。

【図 10】本発明の第 2 の実施例の標的ポリヌクレオチド捕獲領域を持つ基板 1 と標的ポリヌクレオチド捕獲領域における捕獲状態を検知するための光学系との関係を示す図である。

【図 11】図 10 に示す基板 1 の A-A 断面図を示す。

【図 12】A-C に第 2 の実施例の基板 1 の温度制御部 133 の B-B 断面、C-C 断面および D-D 断面の断面図を示す。

【図 13】第 2 の実施例のポリヌクレオチド分離セル 2

51 とその関連装置のブロック図を示す。

【図 14】第 2 の実施例のポリヌクレオチド分離セル 251 の G-G 断面図を示す。

【図 15】第 2 の実施例のポリヌクレオチド分離セルの分離プロセスを説明するタイムテーブルを示す。

【図 16】本発明の第 3 の実施例による基板 1 でプローブを安定に固定できた様子を示す図である。

【図 17】(A) から (C) は第 3 の実施例の基板による効果を確認する実験結果を説明する図である。

【図 18】(A)、(B) は第 3 の実施例による基板によってプローブに捕獲された標的オリゴヌクレオチドが効果的に解離、回収出来ることを説明する図である。

【図 19】本実施例による二本鎖ポリヌクレオチドの分取について説明する電気泳動の結果を模式的に示す図である。

【図 20】第 4 の実施例で採用できる細管の外断面図である。

【図 21】第 4 の実施例で採用できる細管の A-A 断面図である。

【図 22】標的ポリヌクレオチド捕獲領域にプローブを固定するための構造の例を説明する図である。

【図 23】第 4 の実施例のポリヌクレオチド分離装置の全体構成を示す図である。

【図 24】第 4 の実施例のポリヌクレオチド分離モジュール 431 の B-B 断面を示す図である。

【図 25】図 24 に示した実施例のポリヌクレオチド分離モジュール 431 の変形例を示す図である。

【図 26】図 24 に示した実施例のポリヌクレオチド分離モジュール 431 の変形例を示す図である。

【図 27】図 26 に示した実施例のポリヌクレオチド分離モジュール 431 の変形例を示す図である。

【図 28】第 5 の実施例の基本要素を示す図である。

【図 29】図 28 で説明した基本要素を持つポリヌクレオチド分離セルと光学系を組み合わせた本実施例の基本構成を示す図である。

【図 30】図 29 で説明した分離セルの A-A 断面を示す図である。

【図 31】(A) は図 28 で説明した基板の表面に標的ポリヌクレオチド捕獲領域が形成されている状態を示す図、(B) はポリヌクレオチド分離セル内に血液試料が導入され白血球が基板の表面上を漂遊している状態を示す図、(C) は交流電場によって白血球が標的ポリヌクレオチド捕獲領域に引き寄せられ、各領域に白血球が配置された状態を示す図、(D) は抗原物質に対して抗体反応する白血球のみが標識された蛍光を発するようになった状態を示す図、(E) は標的ポリヌクレオチド捕獲領域の各領域に固定された白血球のひとつのみが破壊された結果、これが基板上から無くなった状態を示す図である。

【図 32】(A) は標的ポリヌクレオチド捕獲領域の一

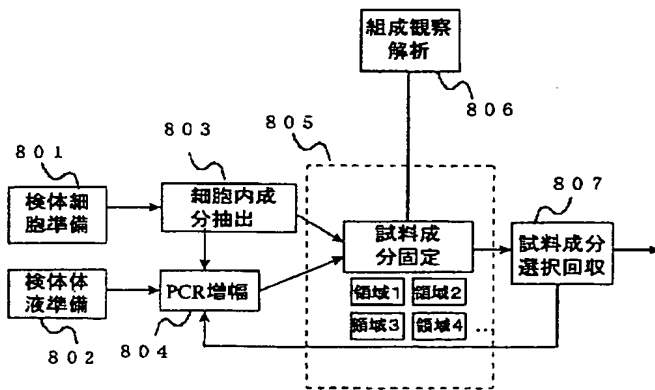
つにブローブが固定されている状況を示す図、(B)は標的ポリヌクレオチド捕獲領域に白血球が誘引され、捕獲された状態を示す図、(C)はポリヌクレオチドおよび蛋白質が電気泳動により反対方向に移動する様子を模式的に示す図、(D)は標的ポリヌクレオチド捕獲領域のブローブに結合しなかったポリヌクレオチドが電気泳動により移動する様子を模式的に示す図である。

【符号の説明】

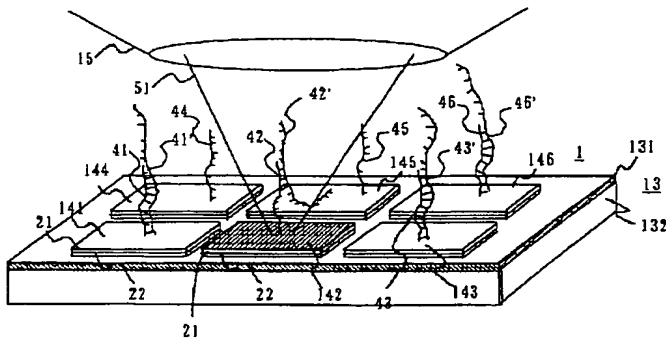
1…基板、13…基板ベース、131…導電性膜、132…熱伝導性絶縁基板、14、141、142、143、144、145、146…核酸結合領域、15…対物レンズ、151…バンドパスフィルター、152…エミッションフィルター、16…蛍光観察用光源、17…

レーザー光源、１８１、１８２…ダイクロイックミラ
ー、１８３…ミラー、１９１…検出器、１９２…解析装
置部、２１…光吸収層、２２…断熱層、２３、２４…微
粒子、３１…ヒーター、３２、３４、３５…ベルチエ素
子、３３…冷却板、４１、４３、４４、４７…基板上に
固定したオリゴヌクレオチドと結合した核酸試料、４
２、４５、４６…基板上に固定したオリゴヌクレオチ
ド、５１…集束光、７…核酸分離セル、７１１、７１
２、７１３…試料出入口口、７１４…孔、７２１…セル
上板、７２２…セル下板、７２３…スパーサー、７３
１、７３２、７３３…試料室、７４１…核酸分離セル保
持治具、７４２、７４３、７４４…レール、７５１、７
５２、７５３、７５４、７５５…電極。

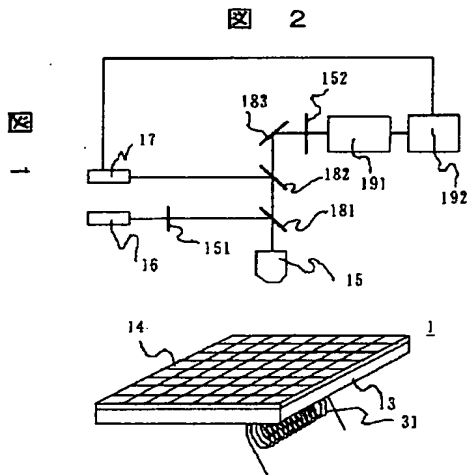
【図 1】



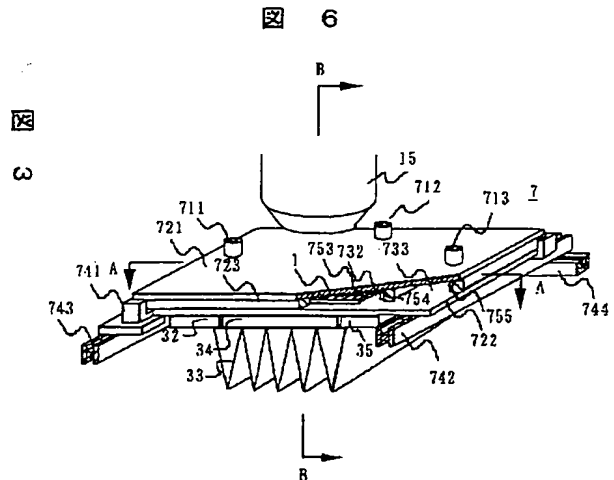
【図 3】



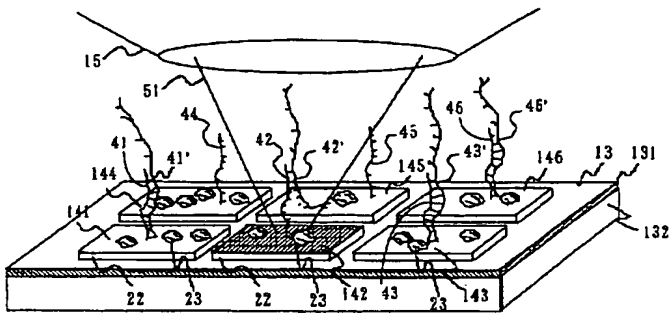
【図 2】



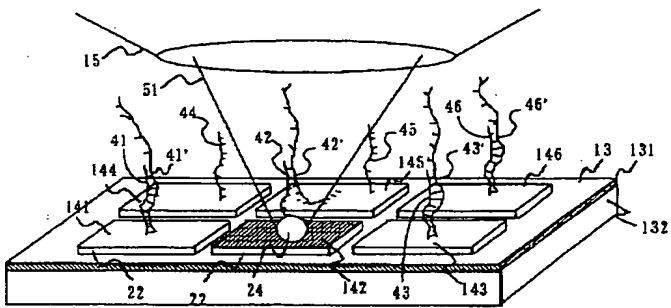
【図 6】



【図 4】

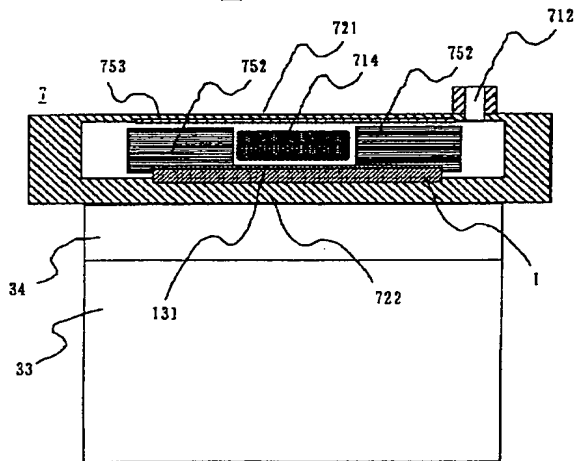


【図 5】



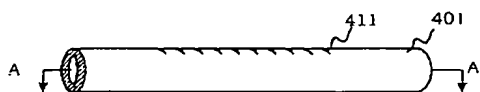
【図 8】

図 8



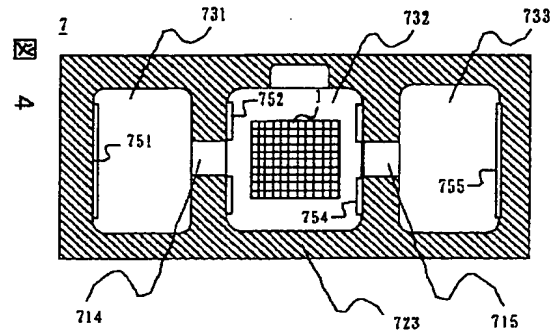
【図 20】

図 20

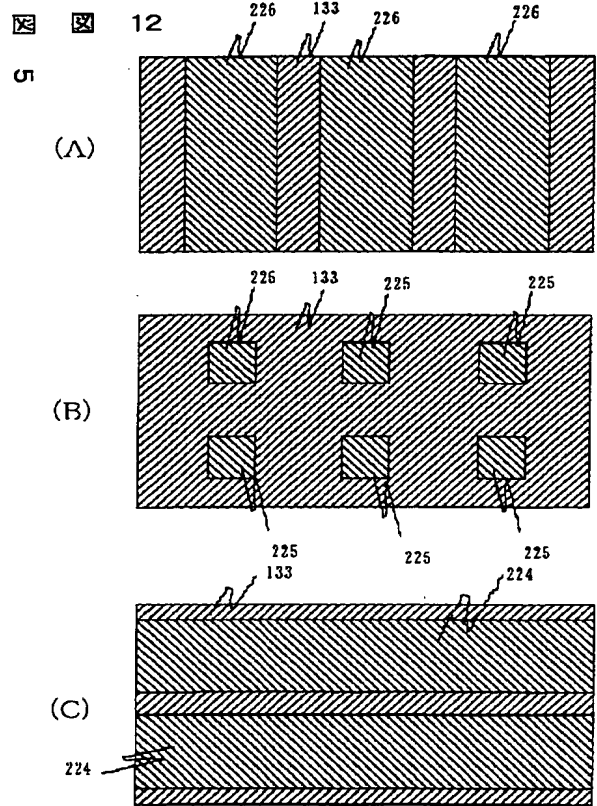


【図 7】

図 7

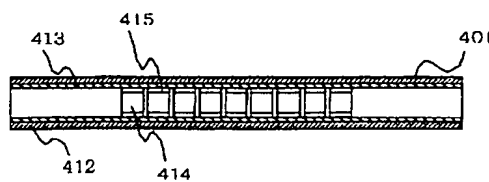


【図 12】

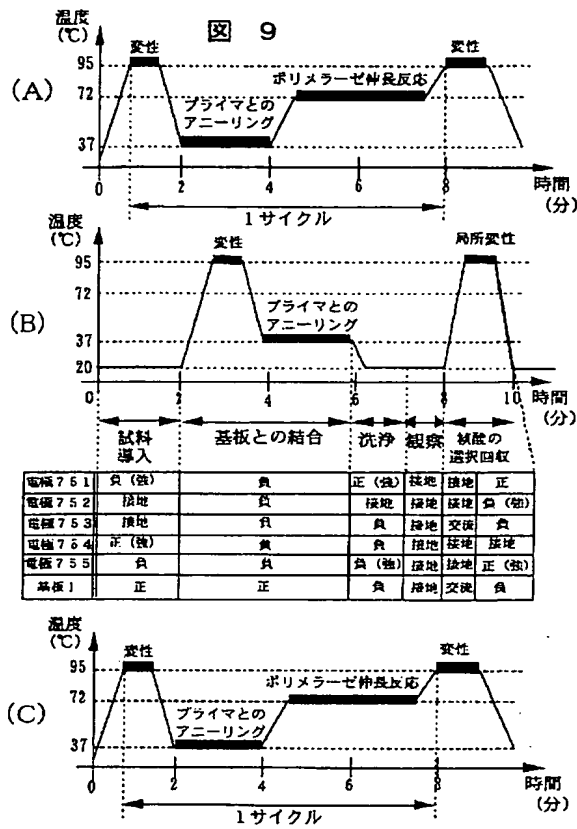


【図 21】

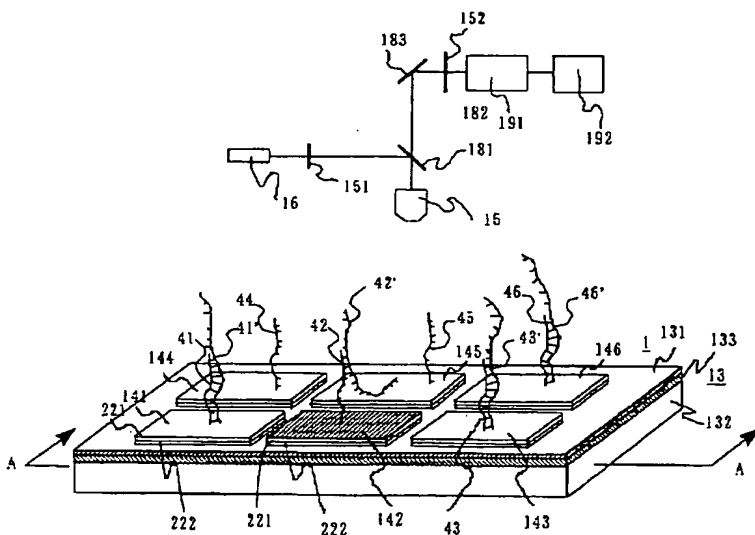
図 21



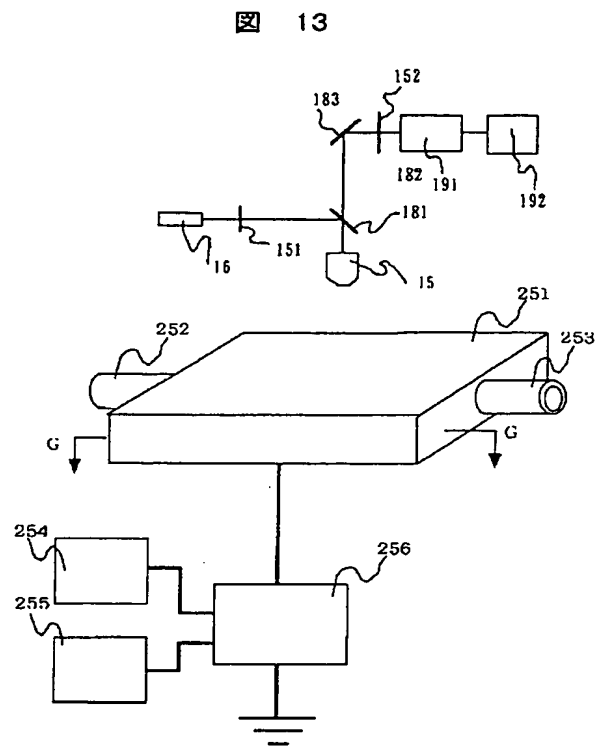
【図9】



【図10】

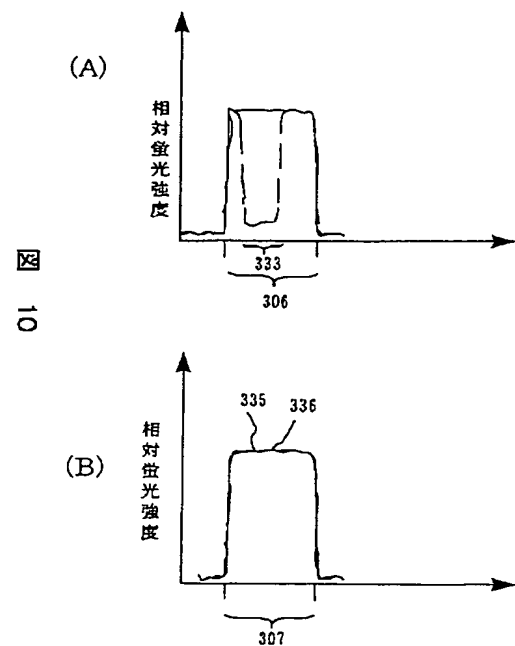


【図13】

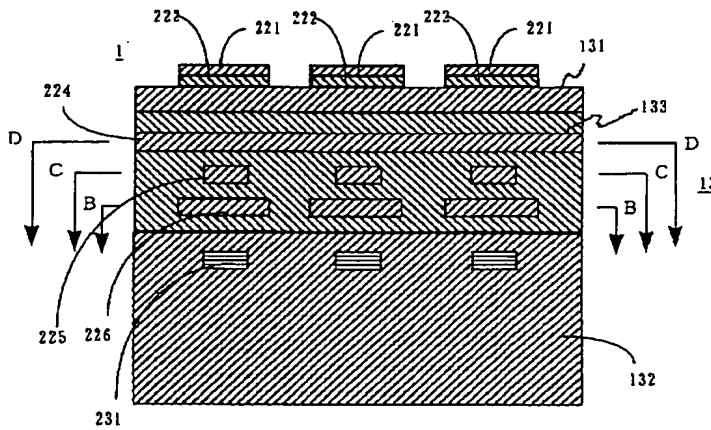


【図18】

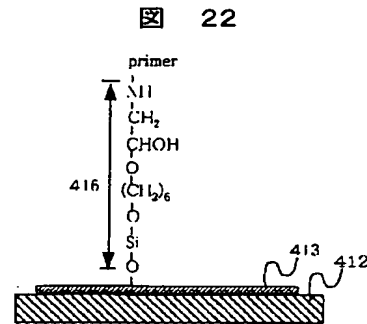
図 18



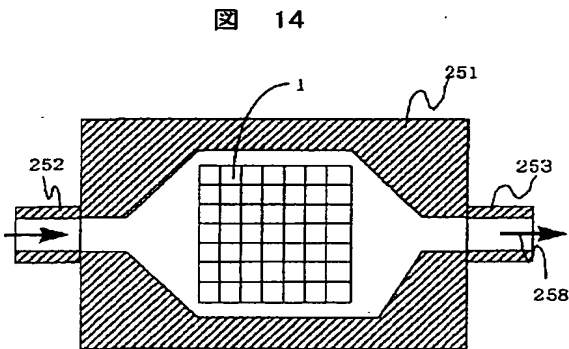
【図 1 1】



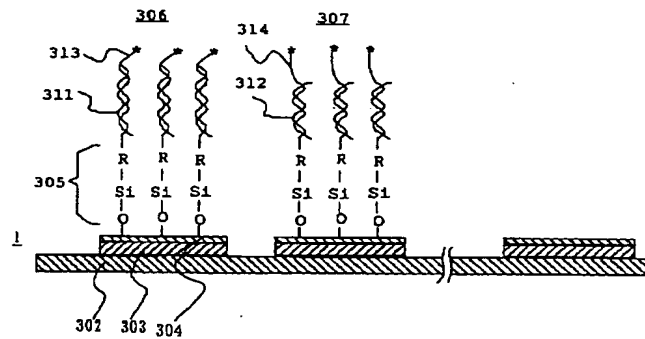
【图 2 2】



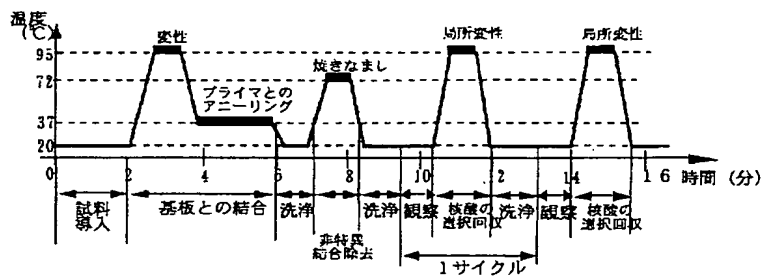
【図 14】



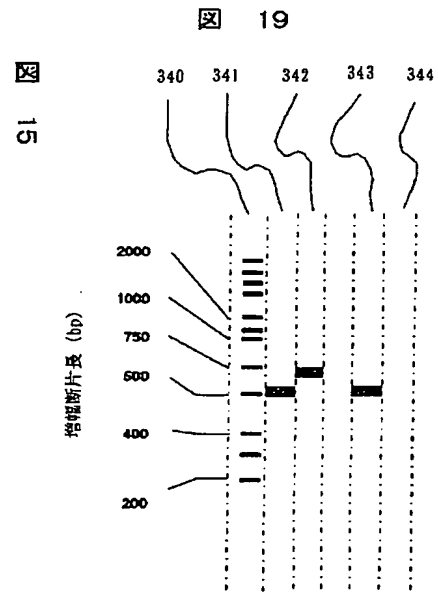
【图 16】



【図 15】

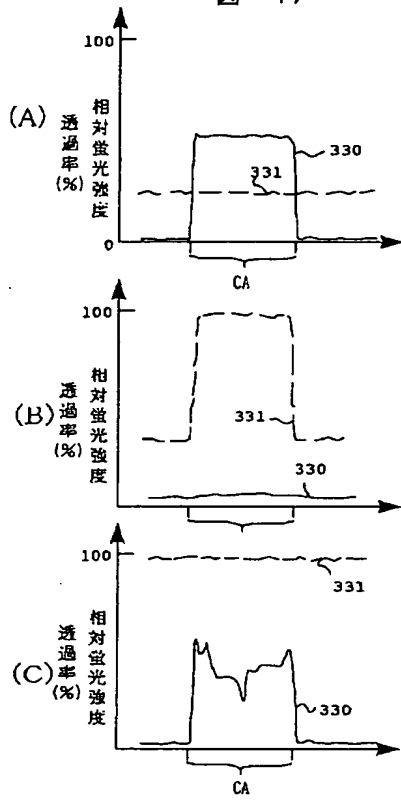


【図 19】



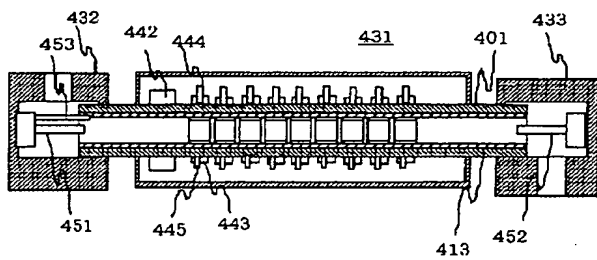
【図17】

図 17

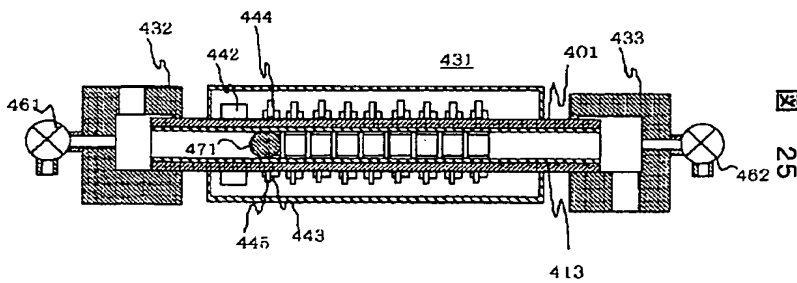


【図24】

図 24

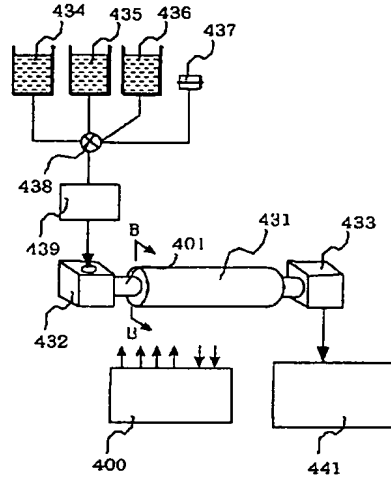


【図25】



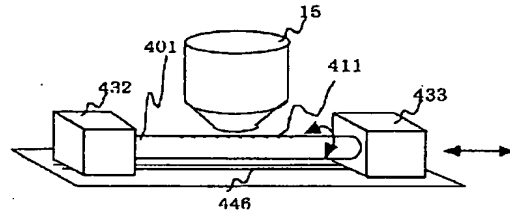
【図23】

図 23



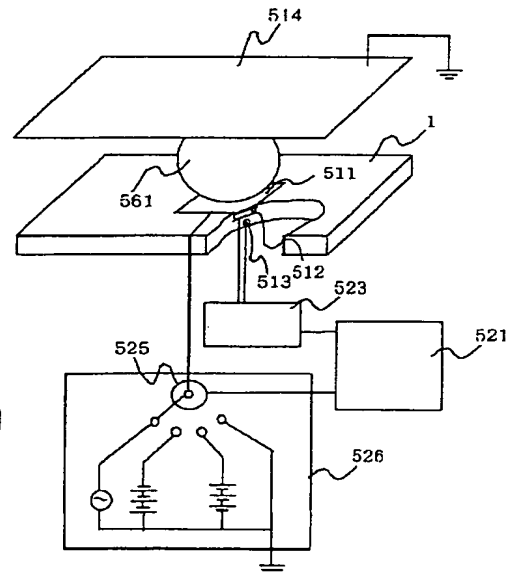
【図26】

図 26



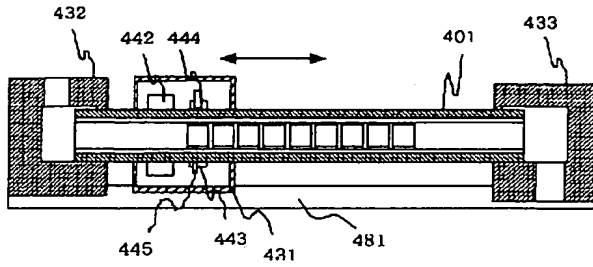
【図28】

図 28



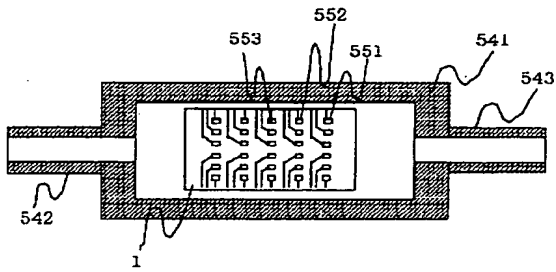
【図 27】

図 27



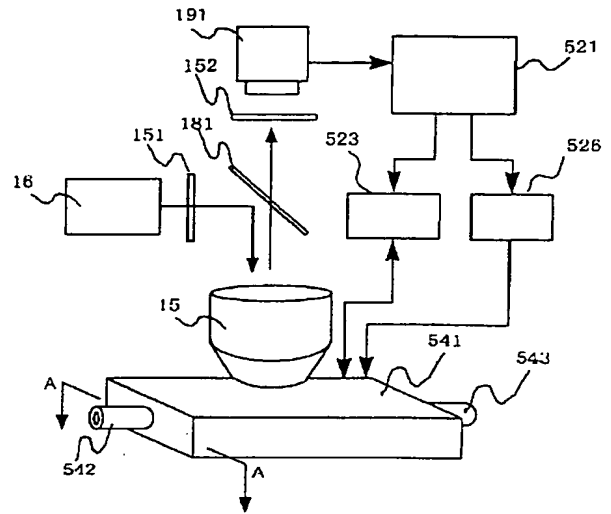
【図 30】

図 30



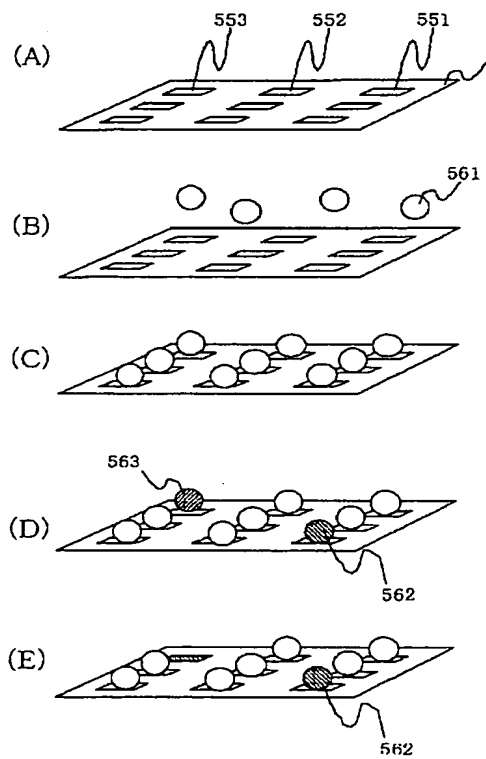
【図 29】

図 29



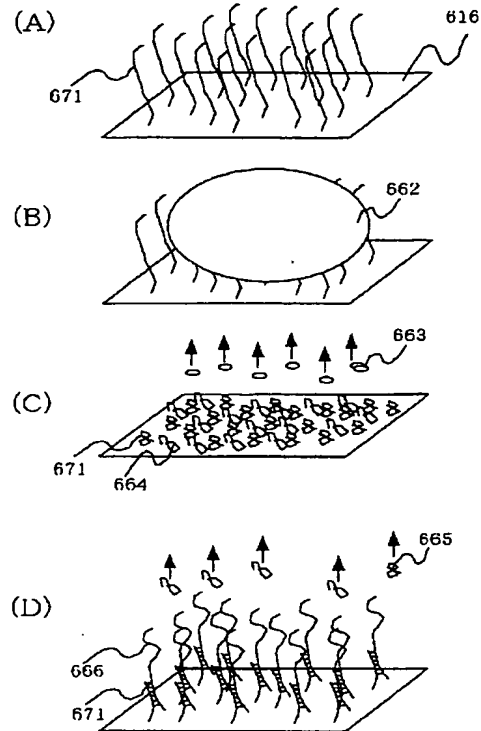
【図 31】

図 31



【図 32】

図 32



フロントページの続き

(31) 優先権主張番号 特願平11-18004

(32) 優先日 平成11年1月27日(1999. 1. 27)

(33) 優先権主張国 日本(JP)

(72) 発明者 加藤 宏一

埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地株式会社

日立製作所基礎研究所内

Fターム(参考) 2G045 AA35 BB50 CB01 CB21 DA12

FA29 FB02 FB07 FB12 FB15

GC15 HA09 JA05

4B024 AA19 AA20 CA01 CA09 CA11

HA13 HA14

4B029 AA07 AA21 AA23 AA24 AA25

BB01 BB20 CC01 CC02 CC03

CC08 CC11 FA12 FA15

4B063 QA01 QA13 QA18 QA20 QQ08

QQ09 QQ42 QQ52 QR32 QR35

QR38 QR41 QR55 QR66 QR82

QS34 QS39 QX02